

Т.П. Сандырева¹, Н.А. Герасимова¹, А.Э. Лопатухин², Д.Е. Киреев², Д.А. Кувед², Г.А. Шипулин²,
А.С. Подымова¹

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ В ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РАССЛЕДОВАНИЯХ СЛУЧАЕВ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

¹ГБУЗ «Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», 620102, Екатеринбург, ул. Ясная, 46;

²ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1 применен при эпидемиологическом расследовании случая групповой заболеваемости ВИЧ-инфекцией для выявления генетического родства и верификации клинко-эпидемиологических выводов. В статье также поднимаются вопросы, решение которых улучшит качество проведения подобных исследований.

Ключевые слова: ВИЧ; филогенетический анализ; передача ВИЧ.

T. P. Sandyreva¹, N. A. Gerasimova¹, A. E. Lopatukhin², D. E. Kireev², D. A. Kuevda², G. A. Shipulin², A. S. Podymova¹

PHYLOGENETIC ANALYSIS IN EPIDEMIOLOGICAL INVESTIGATIONS OF CASES OF HIV INFECTION

¹Sverdlovsk Regional Center for prevention of AIDS and Infectious Diseases and Combating the Spread of AIDS, 24, Turgenev Str., Sverdlovsk region, Ekaterinburg, Russian Federation, 620075

²Central Research Institute of Epidemiology of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 3a, Novogireevskaya Str., Moscow, Russian Federation, 111123,

Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of HIV-1 variants was applied in epidemiological investigation of the case of the group incidence of HIV infection for identification of the genetic relatedness and verification of clinical and epidemiological findings. The article also raises issues the solution of which will improve the quality of the performance of such investigations.

Key words: HIV; phylogenetic analysis; HIV transmission

С увеличением количества ВИЧ-инфицированных лиц расследование случаев ВИЧ-инфекции становится необходимой и часто используемой мерой. Основным методом, применяющимся при этом, является эпидемиологическое расследование. В рамках проведения эпидемиологического расследования передачи ВИЧ-инфекции, особенно в нозокомиальных очагах и криминальных случаях, возникает потребность в получении объективных данных о связи между предполагаемым источником инфекции и реципиентом. Однако не во всех случаях результаты эпидемиологического расследования позволяют определить истинный источник ВИЧ-инфекции и подтвердить предполагаемые связи. С этой целью могут быть использованы современные методы молекулярной диагностики.

В течение пяти месяцев 2011–2012 гг. были зарегистрированы 3 случая заражения замужних, социально-адаптированных женщин репродуктивного возраста ВИЧ, у которых постоянные половые партнеры имели отрицательный ВИЧ-статус. В ходе эпидемиологического расследования было выяснено, что женщины получали медицинскую помощь в учреждении, занимающемся вспомогательными репродуктивными технологиями, и сделано предполо-

жение о нозокомиальном случае инфицирования. Было проведено серологическое обследование круга контактных лиц, включая сотрудников клиники, и выявлен ВИЧ-инфицированный сотрудник, задействованный в оказании помощи пострадавшим женщинам как донор для процедуры цитоиммунизации. Собранные эпидемиологические данные указывали на сотрудника, как на предполагаемый источник ВИЧ-инфекции.

Согласно существующим рекомендациям «Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противозидемических мероприятий» [1], в Российской Федерации при эпидемиологическом расследовании может применяться генотипирование с целью определения субтипа штаммов ВИЧ-1. Выявление в исследуемых образцах штаммов разных субтипов ВИЧ-1 свидетельствует о получении инфекции из разных источников и отсутствии эпидемиологической связи. В России наиболее распространенным является субтип А1 ВИЧ-1, который встречается более чем в 80% случаев [2]. Поэтому результаты субтипирования вируса часто оказываются неинформативны для эпидемиологического расследования.

Филогенетический анализ как способ установления генетического родства между вариантами ВИЧ-1 на основе сравнения вирусных геномов успешно применяется в эпидемиологических расследованиях за рубежом с 1990 г. [3–5]. В нашей стране отсутствуют опубликованные работы по данной

Для корреспонденции: Сандырева Татьяна Павловна, зав. отделением лабораторной диагностики «ГБУЗ Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», e-mail: sandyreva@mail.ru

теме. Вместе с тем в связи с широким распространением ВИЧ-инфекции существует острая необходимость стандартизации и внедрения филогенетического анализа в эпидемиологическое расследование. Достоверность результатов филогенетического анализа чрезвычайно важна, так как они могут быть использованы в качестве доказательств передачи при расследовании случаев ВИЧ-инфекции в ходе судебного процесса, например в нозокомиальных очагах или при профессиональном инфицировании.

В данной работе представлены результаты филогенетического анализа при расследовании групповых случаев ВИЧ-инфекции, выполненного на основе зарубежных рекомендаций "The use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigation of HIV transmission" [6], для верификации выводов, полученных при классическом эпидемиологическом подходе.

Материалы и методы

Исследования проводились в отделении лабораторной диагностики ГБУЗ СО "Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями" и затем были верифицированы в ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Были собраны образцы плазмы крови от четырех инфицированных женщин, одна из которых была предполагаемым источником для остальных. Для установления генетического родства между вариантами ВИЧ исследуемой группы и циркулирующими вариантами в популяции ВИЧ-инфицированных лиц на территории Свердловской области в качестве локального контроля в исследование были включены 50 образцов плазмы крови пациентов, проживающих в данном регионе, в возрасте 22–35 лет, большинство (72%) – женщины, заразившиеся в течение последних двух лет.

Для получения нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1 по регионам гена протеазы (*pro*) и обратной транскриптазы (*rev*) использовался набор реагентов ViroSeq (Abbott, США), региона гена белков оболочки (*env*) – набор реагентов "АмплиСенс HIV-Resist-Seq" (ФБУН ЦНИИ эпиде-

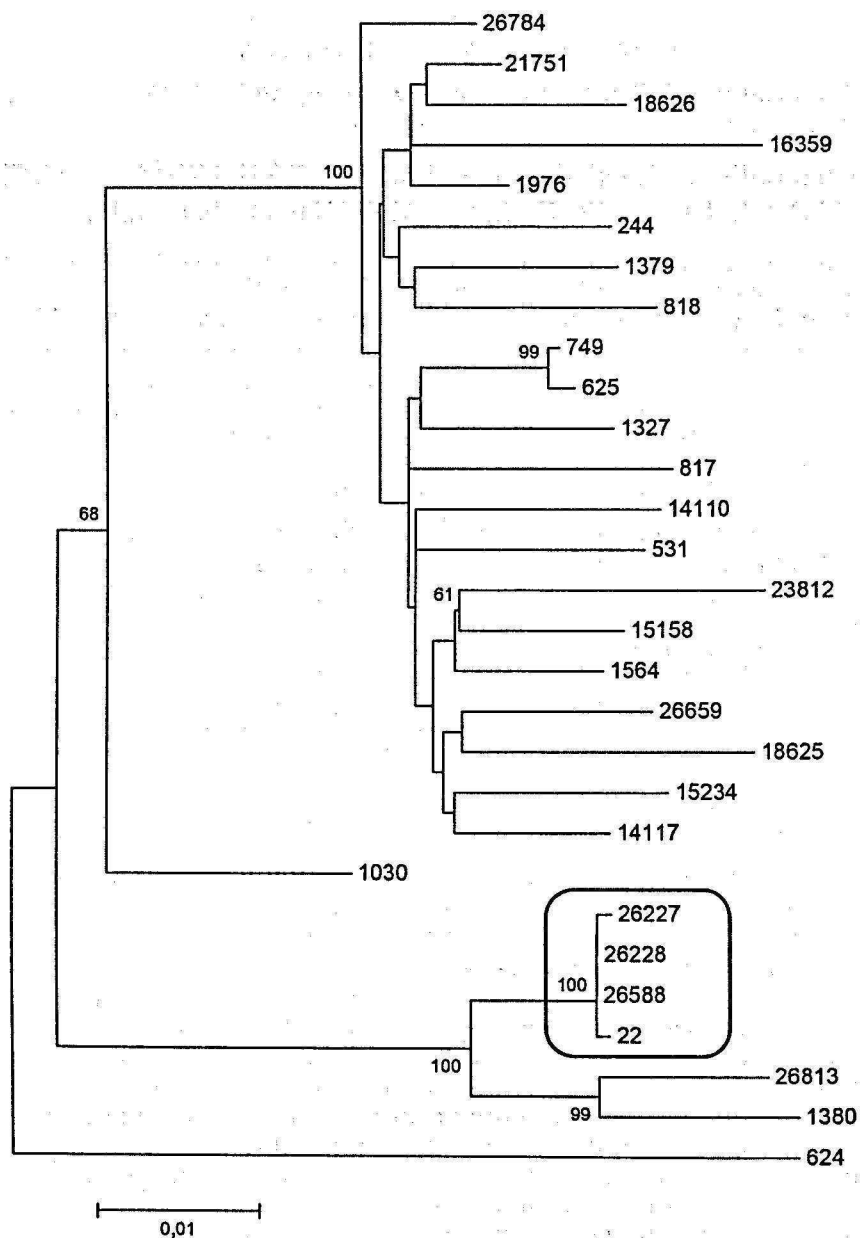


Рис. 1. Филогенетическое дерево образцов исследуемой группы (22, 26227, 26228, 26588) и группы сравнения, построенное на основании нуклеотидных последовательностей региона *pol*.

миологии, Россия), согласно инструкции производителя. Исследование проводили методом прямого автоматического секвенирования по обеим цепям с использованием генетического анализатора ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Обработка данных секвенирования и получение консенсусной нуклеотидной последовательности для региона *pol* проводились с помощью программного обеспечения Viroseq HIV-1 Genotyping System Software v.2.8 (Celera, США), для региона *env* – с помощью программного обеспечения ДЕОНА (ООО "МедАйтиГрупп", Россия). В результате получали

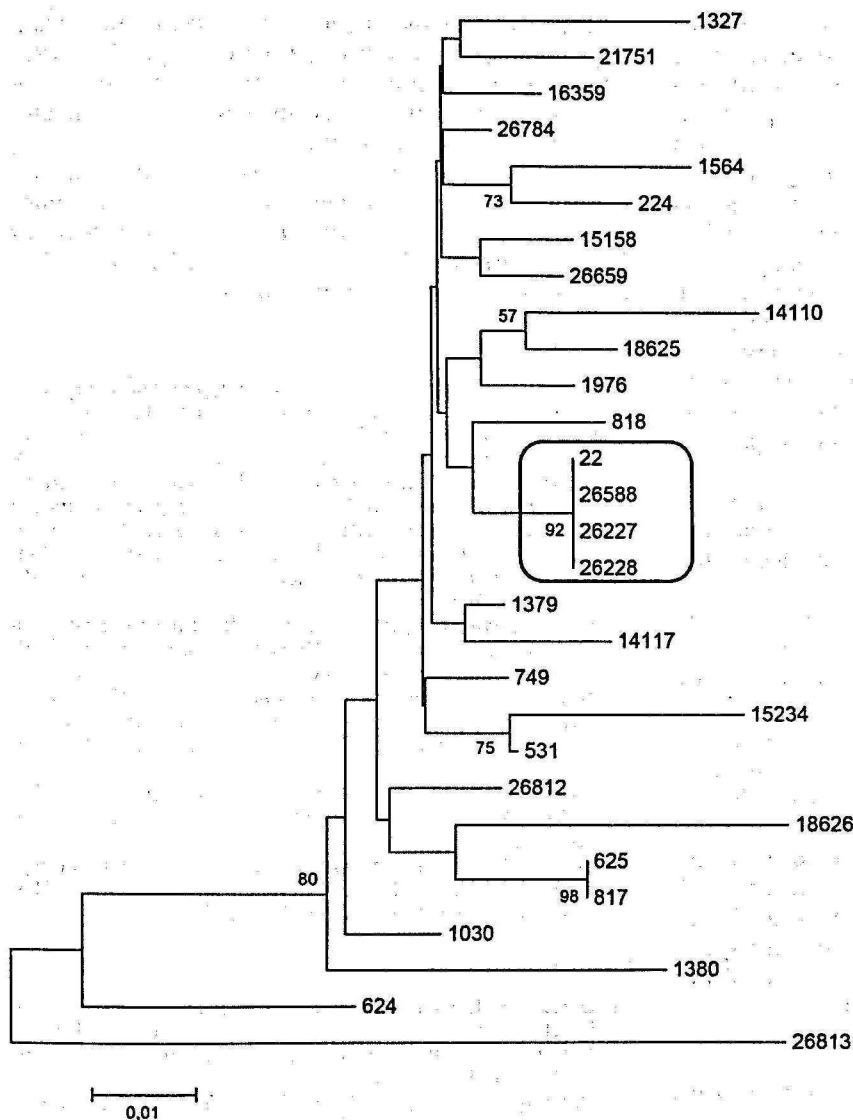


Рис. 2. Филогенетическое дерево образцов исследуемой группы (22, 26227, 26228, 26588) и группы сравнения, построенное на основании нуклеотидных последовательностей региона env.

специфические фрагменты ДНК: регион генов *pro* и *rev* – 1302 пары нуклеотидов (п.н.) и регион *env* – 424 п.н.

Дальнейшую работу с нуклеотидными последовательностями (множественное выравнивание, расчет генетических дистанций и построение филогенетических деревьев) проводили с помощью программного обеспечения BioEdit version 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) и MEGA version 5 (<http://www.megasoftware.net>) с использованием статистического метода Maximum Likelihood analysis (bootstrap level 1000). Субтипирование штаммов ВИЧ-1 проводили с помощью программного обеспечения COMET HIV-1/2 and HCV (<http://comet.retrovirology.lu>) и REGA HIV-1 Sybtyping Tool v.2.0 (<http://dbpartners.stanford.edu>).

Нуклеотидные последовательности исследуемой группы депонированы в GeneBank с присвоенными уникальными номерами для образцов 22, 26227, 26228, 26558 соответственно по гену *pol* KF147834 – KF147837, по гену *env* KF147838 – KF147841.

Результаты и обсуждение

Увеличение числа ВИЧ-инфицированных пациентов среди лиц, получающих медицинскую помощь, а также рост числа случаев ВИЧ-инфекции среди доноров крови и медицинского персонала повышает риски нозокомиального механизма передачи инфекции.

В ходе проведения эпидемиологического расследования был выявлен ограниченный круг лиц, которые могли составлять цепь передачи с одним источником и несколькими реципиентами. Для подтверждения данных, полученных в ходе эпидемиологического расследования, было проведено молекулярно-биологическое исследование, включающее субтипирование и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вариантов ВИЧ-1 пациенток и предполагаемого источника.

Результаты субтипирования нуклеотидных последовательностей показали, что все образцы исследуемой группы относятся к уникальной рекомбинантной форме URF A1/CRF03. Большинство образцов группы сравнения по региону *env* и *pol* относятся к субтипу A1 ВИЧ-1. Только один образец группы сравнения (№ 624) принадлежал к циркулирующей рекомбинантной форме CRF02_AG по обоим регионам (рис. 1), и для одного образца (№ 26813) получен дискордантный результат субтипирования: CRF03_AB для региона *pol*, и B для региона *env* (рис. 2).

Согласно рекомендациям зарубежных исследователей, основными критериями подбора группы сравнения являются: путь инфицирования, географический регион проживания, сроки инфицирования, социальный контекст, оптимальная численность 20–50 образцов. При сложности подбора локальной контрольной группы возможно использование нуклеотидных последовательностей, депонированных в международных базах данных, руководствуясь

указанными критериями подбора. Для проведения анализа рекомендуется исследовать не менее двух регионов размером в пределах 500 нуклеотидов и более. Необходимо отметить, что выбор фрагментов генома ВИЧ для анализа чрезвычайно важен для обеспечения надежности получаемых результатов.

В филогенетический анализ были включены нуклеотидные последовательности вариантов ВИЧ-1 по регионам *pol* и *env*, полученные от трех реципиентов, и предполагаемого источника, образовавшие исследуемую группу и 50 нуклеотидных последовательностей группы сравнения. По регионам *pol* и *env* проведено выравнивание нуклеотидных последовательностей, приведение их к единому размеру по самой короткой, затем были построены филогенетические деревья. В дальнейшем группу сравнения сократили до 25 образцов наиболее топологически близких к исследуемой группе, оптимизировали дендрограмму без искажения результатов филогенетического анализа (см. рис. 1, 2).

Анализ структуры филогенетических деревьев, построенных по обоим регионам, показал, что образцы, входящие в исследуемую группу, образуют общий кластер, обособленный от образцов группы сравнения. При этом генетическая дистанция среди образцов исследуемой группы составила: по региону *pol* – 1,048–1,503%, по региону *env* – 0%, что значительно меньше, чем между ближайшими образцами исследуемой группы и группы сравнения: 2,149 и 7,873% по регионам *pol* и *env* соответственно. Результаты филогенетического анализа указывают на наличие эпидемиологической связи внутри исследуемой группы, что подтверждает случай нозокомиальной передачи ВИЧ-инфекции.

Заключение

Таким образом, с помощью филогенетического анализа было показано, что степень генетического родства образцов исследуемой группы выше, чем в группе сравнения, что в сочетании с данными эпидемиологического расследования подтверждает участие предполагаемого источника в инфицировании трех женщин.

Однако в тех случаях, когда результаты филогенетического анализа противоречат результатам эпидемиологического расследования или когда проведение филогенетического анализа согласно всем критериям невозможно, результаты филогенетического анализа должны использоваться с осторожностью.

Особую значимость в филогенетическом анализе имеют следующие аспекты: стандартизация этапов исследования и профессионализм лаборатории, соблюдение критериев подбора группы сравнения, выбора анализируемых регионов, размера исследуемых областей и методологии построения филогенетических деревьев, так как результаты могут быть определяющими доказательствами в эпидемиологическом расследовании и использованы в судебном процессе.

В настоящее время существует необходимость в нормативных документах, регламентирующих методологию применения филогенетического анализа в ходе расследования нозокомиальных и криминальных случаев ВИЧ-инфекции.

Авторы статьи благодарны за консультативную и практическую помощь в проведении эпидемиологического расследования и подготовке статьи В.В. Покровскому, Н.Н. Ладной, С.Ю. Ковалеву, С.С. Смирновой, Н.Ю. Пономаренко.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические рекомендации "Эпидемиологическое расследование случая ВИЧ-инфекции и проведение противоэпидемических мероприятий". Утверждены Минздравсоцразвития от 20 сентября 2007 года № 6963-ПХ. М.; 2007; 11–3.
2. Богословская Е.В., Волошина П.В., Браславская С.И., Мызникова А.И., Шипулин Г.А. Изучение распространенности различных субтипов ВИЧ на территории РФ. В кн.: Молекулярная диагностика – 2010: VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. М.; 2010; т. 1: 16–9.
3. Han Z., Leung T.W., Zhao J. et al. A HIV-1 heterosexual transmission chain in Guangzhou, China: a molecular epidemiological study. *Virol. J.* 2009; 6: 148.
4. Machuca R., Jorgensen L.B., Theilade P., Nielsen C. Molecular investigation of transmission of human immunodeficiency virus type 1 in a criminal case. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8 (5): 884–90.
5. Ou C.Y., Ciesielski C.A., Myers G. et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science.* 1992; 256: 1165–71.
6. Bernard E.J., Azad Y., Vandamme A.-M. et al. The use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigation of HIV transmission. *HIV Med.* 2007; 8 (6): 382–7.

REFERENCES

1. Guidelines «Epidemiological investigations into the case of HIV infection and conducting control activities» approved by Russian Ministry of Health, September 20, 2007 N 6963-PX. Moscow, 2007; 11–3. (in Russian)
2. Bogoslovskaja E.V., Voloshina P.V., Braslavskaja S.I., Myznikova A.I., Shipulin G.A. The study of prevalence of different subtypes of HIV in the Russian Federation. In: Molecular diagnostics 2010: The 7th Russia-wide scientific conference with international participation. Moscow, 2010; т. 1: 16–9. (in Russian)
3. Han Z., Leung T.W., Zhao J. et al. A HIV-1 heterosexual transmission chain in Guangzhou, China: a molecular epidemiological study. *Virol. J.* 2009; 6: 148.
4. Machuca R., Jorgensen L.B., Theilade P., Nielsen C. Molecular investigation of transmission of human immunodeficiency virus type 1 in a criminal case. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8 (5): 884–90.
5. Ou C.Y., Ciesielski C.A., Myers G. et al. Molecular epidemiology of HIV transmission in a dental practice. *Science.* 1992; 256: 1165–71.
6. Bernard E.J., Azad Y., Vandamme A.-M. et al. The use of phylogenetic analysis as evidence in criminal investigation of HIV transmission. *HIV Med.* 2007; 8 (6): 382–7.

Поступила 15.07.13

Сведения об авторах:

Герасимова Наталья Авенировна, канд. биол. наук, врач клинико-диагностической лаб. ГБУЗ Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями, e-mail: ngerasimova2010@gmail.com; *Лопатухин Алексей Эдуардович*, мл. науч. сотр., «ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», e-

mail: lopatukhin@pcr.ru; *Киреев Дмитрий Евгеньевич*, канд. биол. наук, науч. сотр., «ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», e-mail: Dmitry.kireev@pcr.ru; *Куведа Дмитрий Александрович*, науч. сотр., «ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», e-mail: Dmitry.kuevda@pcr.ru; *Шипулин Герман Александрович*,

канд. мед. наук, зав. отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии, «ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», e-mail: german@pcr.ru; *Подымова Анжелика Сергеевна*, канд. мед. наук, гл. врач «ГБУЗ Свердловский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», e-mail: org@livehiv.ru

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014.

УДК 616.98:579.842.23]-036.22(571.12)

В.В. Мefодьев¹, К.Г. Перминова², О.А. Дубинина²

МОНИТОРИНГ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ИЕРСИНИОЗАМИ И ОБСЕМЕНЕННОСТИ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ЭТИМИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ В ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Сообщение 1. Закономерности эпидемического процесса иерсиниозов в Тюменской области

¹ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздрава России, 625017, Тюмень, ул. Одесская, 54;

²Управление Роспотребнадзора по Тюменской области, 625026, Тюмень, ул. Геологоразведчиков, 1

Проведен ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости псевдотуберкулезом и кишечным иерсиниозом в Тюменской области за 19-летний период. Установлена стабилизация заболеваемости этими инфекциями в многолетней динамике, что обусловлено постоянно действующими факторами. Установлены территории риска (г. Тюмень, 1 сельский район лесостепи и 3 сельских района южной тайги), группы риска дети 3–6 и 7–14 лет для псевдотуберкулеза и дети 3–6 лет для кишечного иерсиниоза; время риска – январь–июнь для псевдотуберкулеза и январь, март, май, июнь, август, октябрь для кишечного иерсиниоза. Интенсивность обсемененности овощей и фруктов иерсиниями по месяцам коррелирует с показателями заболеваемости этими инфекциями (средняя, умеренная связь; $r=0,57\pm 0,19$). Для управления эпидемическим процессом иерсиниозов целесообразно совершенствование системы эпидемиологического надзора и разработка программ взаимосвязи и взаимодействия между заинтересованными органами и учреждениями Роспотребнадзора, Госагропрома и образовательной сферы.

Ключевые слова: эпидемический процесс; псевдотуберкулез; динамика; факторы риска.

V. V. Mefodiev¹, K. G. Perminova², O. A. Dubinina²

MONITORING FOR INCIDENCE OF YERSINIOSIS AND ENVIRONMENTAL CONTAMINATION BY THESE PATHOGENS IN THE TYUMEN REGION

Report 1. Regularities of the epidemic process of Yersinioses iersiniozov in the Tyumen region

¹Tyumen State Medical Academy, 54, Odesskaya Str., Tyumen, Russian Federation, 625023

²Department of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance of the Tyumen region, Tyumen, Russian Federation, 625017

There was performed a retrospective epidemiological analysis of the incidence of Yersiniosis (Infections due to Yersiniosis enterocolitica and Yersiniosis pseudotuberculosis) in the Tyumen region for the 19-year period.

There was established the stabilization of the incidence of these infections in the long-term dynamics, that is caused by constant acting factors. There are determined risk territories (Tyumen, one rural forest-steppe district and three rural districts of southern boreal forest), risk groups: children aged 3-6 and 7-14 years for Yersiniosis enterocolitica and Yersiniosis pseudotuberculosis and children 3-6 of years - for Yersiniosis enterocolitica, risk time: January – June for pseudotuberculosis and for January, March, May, June, August, October - for Yersiniosis enterocolitica. The intensity of contamination of vegetables and fruits by Yersinia-bacterias on months correlates with incidence of these infections (average, moderate relationship; $r = 0,57 \pm 0,19$). To control the epidemic process of Yersinioses there is reasonable the improvement of the system of epidemiological surveillance and elaboration of the program of interrelationship and interaction between involved bodies and institutions of The Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, State Agricultural Committee and the educational sphere.

Key words: the epidemic process; pseudotuberculosis; dynamics; risk factors.

Псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз – зоо-сапронозные инфекции, обусловленные *Yersinia pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*, встречаются

Для корреспонденции: *Мefодьев Владимир Васильевич*, доктор мед. наук, проф., проф. каф. медико-профилактического отдела ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения России, 625017, Тюмень, Одесская, 54, e-mail: vmefodyev@mail.ru

на территории всей России, но характеризуются различиями в интенсивности проявления заболеваемости в отдельных ее регионах [1]. Несмотря на значительные результаты в области изучения этиологии, диагностики, эпидемиологии и профилактики этих инфекций, состояние вопросов эпидемиологического надзора и контроля требует дальнейшей разработки, учитывая региональные особенности этой патоло-